

Universidad Nacional de La Plata.
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.



Informe de Trabajo Final

**“Nueva alternativa para el control biológico
de *Spodoptera frugiperda* en maíz con el
hongo endófito *Beauveria bassiana*”**

Alumno: Cieri, Enzo Gonzalo.

Legajo N°: 25922/2.

Director: Ing. Agr. Dal Bello, Gustavo Mariano.

Codirectora: Ing. Agr. Padín, Susana Beatriz.

Fecha de entrega: 12/04/2017

Lugar de realización: Curso de Terapéutica Vegetal y
Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI).

AGRADECIMIENTOS

A través de este espacio que me brinda la realización de este trabajo final para alcanzar la meta que se propone todo estudiante de esta facultad, quiero expresar mi agradecimiento a aquellos profesionales que me orientaron y ayudaron para que la misma llegue a su fin.

En primer lugar, quiero destacar a la Ing. Agr. Susana Padín y al Ing. Agr. Gustavo Dal Bello quienes me ofrecieron esta propuesta de trabajo final. Sus correcciones y su permanente disposición fue un factor determinante para la culminación de mi tesis.

Su ayuda ha sido un pilar más que importante en el desarrollo de mi tesina; no sólo por su permanente disposición a la hora de trabajar en el laboratorio, sino guiándome también en cada paso de este trabajo.

Del mismo modo agradecerles a mis evaluadoras Mónica Ricci y Marina Stocco, quienes con sus conocimientos y correcciones contribuyeron en mi trabajo. Quiero destacar también la seriedad con que estos profesionales se tomaron la responsabilidad de corregir mi trabajo final, lo cual fue de suma importancia para desarrollarlo en término.

A su vez, deseo expresar mi gratitud a la Cátedra de Terapéutica Vegetal y el Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) quienes pusieron a mi disposición todos los materiales de laboratorio con los que cuentan y sin los cuales no hubiese podido realizar mis ensayos.

Por último, quiero agradecer a toda mi familia y en particular a mis padres Javier y Claudia, quienes hicieron todo lo imposible para darme esta posibilidad y por todo su apoyo, confianza y dedicación incondicional en todo momento de mi vida.

ÍNDICE

Resumen.....	4
Introducción.....	5
-Objetivos	
-Hipótesis.....	9
Materiales y Métodos.....	10
-Material entomológico.....	10
-Hongos entomopatógenos.....	10
-Preparación del material de laboratorio.....	11
-Aislamiento de <i>Beauveria bassiana</i>	11
-Preparación del inóculo.....	12
-Inoculación de <i>B. bassiana</i>	13
Evaluación de la capacidad endófito de <i>B. bassiana</i>	14
Evaluación del control biológico de <i>B. bassiana</i> sobre <i>Spodoptera frugiperda</i>	15
Resultados.....	17
Conclusiones.....	18
Bibliografía.....	19
Anexo.....	25

RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los principales cultivos a nivel mundial y entre los cereales el de mayor volumen de producción, superando incluso al trigo y al arroz.

La producción de maíz en Argentina representa en la actualidad el 25% de los cuatro principales cultivos exportables, mostrando gran importancia económica y social. Sin embargo, el rendimiento de este cereal es reducido por el ataque de numerosos insectos plaga, incluyendo entre los más destructivos a *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), conocida comúnmente como "cogollero del maíz" u "oruga militar tardía", que ocasiona daños durante todo el ciclo del cultivo. Las medidas de control convencionales se basan en la aplicación frecuente de insecticidas órgano-sintéticos, que por su amplio espectro de acción eliminan a la plaga y a sus enemigos naturales dejando residuos tóxicos para el ambiente, el hombre y los animales. Asimismo, la constante exposición a los tratamientos químicos, ha inducido a desarrollar poblaciones resistentes a los insecticidas. Como consecuencia, las tendencias actuales en el manejo integrado de plagas se orientan hacia la preservación de los agroecosistemas incluyendo el uso de bioplaguicidas. Estos productos naturales son altamente específicos contra las plagas, representan poco o ningún riesgo para las personas o el medio y no generan fenómenos de resistencia. Entre esos agentes se encuentran diferentes especies de hongos entomopatógenos, especialmente *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Al respecto, el objetivo de este trabajo fue investigar la capacidad insecticida de *B. bassiana* en plantas de maíz para el manejo integrado de *S. frugiperda*, comparada con el insecticida clorpirifós.

INTRODUCCIÓN

El paradigma de la agricultura sustentable es una tendencia mundial avalada por los cambios científico tecnológicos, sociales y económicos que en forma sostenida han llevado a replantear las prácticas agrícolas tradicionales y obligan a estudiar nuevas estrategias de manejo para resolver el agotamiento de los recursos naturales, la destrucción del ambiente, el excesivo uso de insumos sintéticos y la creciente demanda de alimentos. El control de insectos plaga en los cultivos extensivos no escapa al modelo agroecológico, opuesto al uso excluyente de insecticidas químicos que causan importantes problemas ambientales por la contaminación del suelo y de las napas freáticas, resistencia a los plaguicidas, destrucción de fauna benéfica, resurgencia de plagas y graves riesgos para la salud humana. Como alternativa al control químico, surgió en la década del 70 el Manejo Integrado de Plagas (MIP), que busca combinar y compatibilizar las distintas técnicas de control: químico, biológico y cultural, con un enfoque multidisciplinario que resulta superador, porque no pretende el exterminio de ningún organismo sino mantener las poblaciones de plagas debajo del umbral de daño económico. Los plaguicidas biológicos son una de las herramientas fundamentales del MIP, ya que no dejan residuos nocivos para el hombre y el ambiente ni generan fenómenos de resistencia en los insectos (Roberts, 1989; Lecuona, 1996). Entre los bioplaguicidas de origen fúngico, el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) ha sido el agente de control biológico más utilizado debido a su ubicuidad, fácil manejo, versatilidad para penetrar al hospedante y potencial capacidad insecticida sobre numerosas especies (Humber, 1998; Butt *et al.*, 2001; Lacey *et al.*, 2001; Padín *et al.*, 2002; Dal Bello *et al.*, 2006). Actualmente se produce, formula y comercializa en varios países para el control de

numerosos insectos plaga. La infección fúngica en el cuerpo del insecto, origina disturbios a nivel digestivo, nervioso, muscular, respiratorio, excretorio, entre otras afecciones; es decir el insecto se enferma, deja de alimentarse y posteriormente muere en un lapso de tres a cinco días. En el hemocoele, *B. bassiana* produce metabolitos tóxicos de bajo peso molecular que anulan las defensas del insecto y poseen actividad insecticida. Las micotoxinas más conocidas son Bovericina, Enniatinas, Isarolide, Basianolide y Oosporeina (Zizka & Weiser, 1993; Gupta *et al.*, 1995; Castlebury *et al.*, 1999).

El maíz, *Zea mays* Familia *Gramineae*, tribu *Maydeas*, junto con el trigo y el arroz constituyen la base alimentaria de la mayor parte de los pueblos del mundo. La especie es originaria de México y fue seleccionada por los antiguos mexicanos, miles de años antes del pueblo azteca, a partir de una planta silvestre llamada teocintle. El maíz domesticado se distribuyó de las zonas montañosas de México, a las tierras bajas y desde ahí a los demás países (Caballero-Mellado, 2008).

El cultivo del maíz ocupa un lugar preponderante dentro de los sistemas de producción agrícola de Argentina, sólo superado por la soja (Ghida Daza, 2013). Sin embargo, el rendimiento de este cereal es reducido por el ataque de numerosos insectos plaga, incluyendo entre los más destructivos a *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), conocida comúnmente como "cogollero del maíz" u "oruga militar tardía" (Lezama Gutiérrez *et al.*, 2001) (Fig. 1). La plaga ha tenido una creciente incidencia en maíces de la región pampeana y es la más importante del NOA y el NEA requiriendo hasta tres aplicaciones de insecticidas para controlarla (Willink *et al.*, 1990; Willink *et al.*, 1991). En el norte santafesino se presenta una situación similar y según ensayos a campo la permanencia de la plaga durante todo el ciclo vegetativo, produjo pérdidas de rendimiento del 19 al 21 % (Sosa, 2005), acentuándose el daño a medida que se atrasa la siembra.

El maíz es afectado durante todos sus estados fenológicos, sin embargo, las larvas prefieren las plantas más jóvenes (Murúa *et al.*, 2006). Willink *et al.*, (1993) determinaron que, para un mismo lugar y una misma fecha de evaluación, cultivos con plantas de 14 hojas presentaban un 2 % de sus plantas atacadas, mientras que las plantas de ocho o menos hojas tenían un 96 % de infestación. Las larvas son activas de noche y de día, atacan a la planta de maíz actuando como cortadoras, defoliadoras y cogolleras según el estado fenológico del cultivo, causando daños directos cuando se alimentan de los granos de la espiga. Desde el nacimiento hasta la cuarta hoja, la planta puede ser cortada cerca del suelo o bien defoliada parcial o totalmente y cuando se afecta el meristema apical la planta muere (Willink *et al.*, 1993). En sus últimos estadios, el gusano se alimenta de las hojas enrolladas del cogollo, donde produce perforaciones transversales que debilitan y quiebran las hojas, reduciéndose así su capacidad fotosintética. El daño realizado en los estigmas reduce la polinización y disminuye los granos por espiga. Las larvas también se alimentan de las hojas durante la floración y el llenado de granos, influyendo sobre el rendimiento final que está correlacionado directamente con el área foliar.

Las estrategias convencionales de manejo incluyen el control químico y el uso de maíces transgénicos: plantas modificadas genéticamente que expresan la endotoxina insecticida de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). La aplicación exagerada e inadecuada de plaguicidas eleva los costos de producción, altera las poblaciones de enemigos naturales, contamina el ambiente y crea resistencia del insecto a estos productos. Los híbridos transgénicos *Bt* implican una larga exposición de la plaga a la toxina que es producida durante todo el ciclo vegetativo, lo que facilita la selección de individuos resistentes (Casmuz *et al.*, 2010). Estudios realizados comparando sistemas de labranza, encontraron que el cogollero tuvo menor incidencia en siembra directa que en convencional, atribuyendo este hecho a una mayor presencia de enemigos naturales en

el suelo protegido de la siembra directa (Willink *et al.*, 1994, Willink & Osorio, 1994). Actualmente, se conocen diferentes especies de microorganismos entomopatógenos con potencialidad para ser usados en un programa integrado de lucha contra *S. frugiperda*, entre los cuales se incluyen hongos, virus, protozoarios y nemátodos. Dentro de los agentes de control biológico, se destacan especies fúngicas como *Nomuraearileyi*, *Isariafumosorosea* (= *Paecilomycesfumosoroseus*) y *B. bassiana*, cuya eficacia ha sido avalada por el conjunto de resultados obtenidos (Gadner & Fuxa, 1980; Maniania & Fargues, 1985; Lezama Gutiérrez *et al.*, 1996; Lezama Gutiérrez *et al.*, 2001; Villamizar *et al.*, 2004; Vega-Aquino *et al.*, 2010). La información disponible sobre el empleo de hongos entomopatógenos de *S. frugiperda*, a los efectos de complementar el control genético, cultural y químico es escasa en la Argentina, justificando comenzar a investigar esa rama del biocontrol que bien puede representar una solución duradera y efectiva, amigable con el ambiente y altamente específica hacia su hospedante (García *et al.* 2002). Los organismos endófitos, particularmente los hongos, han recibido una creciente atención en los años recientes. Este grupo de microorganismos vive asintóticamente dentro de tejidos vegetales sanos, y ha mostrado poseer un gran potencial agronómico en áreas como la sanidad vegetal. Por ejemplo, ya se comercializan semillas que están infectadas con hongos endófitos, los cuales le proveen a la planta mayor resistencia contra herbívoros y así disminuyen la demanda de insecticidas (Gamboa-Gaitán, 2006). Existen numerosos antecedentes que demuestran la posibilidad de establecer artificialmente a *B. bassiana* como endosimbionte saprófito, protegiendo a las plantas de insectos barrenadores y masticadores (Leckie, 2002; Ownley *et al.*, 2004; Rehner *et al.*, 2006; Akello *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2009; Posada *et al.*, 2010). También en maíz es conocida la colonización endofítica de *B. bassiana* a través de los vasos del xilema, confiriéndole a la planta una defensa natural frente al ataque de insectos (Wagner & Lewis, 2000; Arnold & Lewis, 2005).

Los resultados sugieren que esta novedosa metodología podría utilizarse para el manejo de insectos plaga de los cultivos en programas de manejo integrado de plagas.

Considerando los antecedentes mencionados, el presente trabajo final se propuso investigar la capacidad insecticida de *B. bassiana* en plantas de maíz no *Bt* para el manejo integrado de *S. frugiperda*, con dosis letales y subletales de un insecticida con bajo impacto ambiental como el clorpirifós. Estudios realizados de las propiedades de este principio activo, demostraron que su índice de impacto en aguas subterráneas, aguas superficiales y aire es muy bajo, extremadamente bajo y moderado, respectivamente, mientras que el riesgo toxicológico agudo e impacto global es muy bajo (Menapace *et al.*, 2015).

Se plantea como objetivo general:

“Contribuir con una alternativa agroecológica para el control del gusano cogollero (*S. frugiperda*) en el cultivo de maíz”.

Objetivos particulares:

- Determinar la eficiencia de colonización endófitas de 5 cepas del hongo *B. bassiana* en plantas de maíz comparando tres métodos de inoculación (semillas y plántulas).
- Evaluar el efecto insecticida de las cepas de *B. bassiana* sobre *S. frugiperda*.

Se postula como **Hipótesis**, la siguiente:

“Las cepas nativas del hongo entomopatógeno *B. bassiana* actúan como agentes de control biológico de *S. frugiperda* en plantas de maíz”.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material entomológico

Cría de insectos

Para obtener las larvas de *S. frugiperda* utilizadas en los ensayos se llevó a cabo un entrenamiento en la ciudad de Pergamino con la empresa Agidea, dedicada a la reproducción artificial de insectos plaga. Posteriormente en base a los conocimientos y prácticas adquiridos se realizó la cría en el insectario de la cátedra de Terapéutica vegetal, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (60% y 23°C). Las larvas de insectos para realizar los bioensayos, se obtuvieron en jaulas de reproducción a partir de padres seleccionados de *S. frugiperda*, libres de todo tipo de contaminación con plaguicidas. Con este propósito, se prepararon dietas artificiales en base a maíz molido. Se realizó el seguimiento de los ciclos de vida de la especie para la obtención de generaciones consecutivas de individuos-blancos de las aplicaciones biológicas, y posterior selección de larvas correspondientes al estadio L3 (Fig. 2). Se considera que esta etapa del desarrollo larval ($\leq 1,5$ cm) es el momento óptimo de control, ya que a partir de ese tamaño se alojan en el cogollo dificultando los tratamientos al no ser alcanzadas por el producto aplicado. Si las larvas ya están alojadas en el cogollo, se requerirán

volúmenes de mojado más altos para intentar llegar al objetivo. Una vez estandarizadas las edades, las larvas L3 fueron separadas para ser utilizadas en los bioensayos.

Hongos entomopatógenos

Para su aislamiento, purificación y conservación se tuvieron en cuenta principalmente los trabajos de los siguientes autores: Cañedo y Ames (2004); Lecuona (1996) y Nussenbaum y Lecuona (2012).

1) Preparación del material de laboratorio

Con el objetivo de conservar las condiciones de esterilidad necesarias para evitar la contaminación de las cepas de interés aisladas, todo el material experimental utilizado: cajas de Petri, pipetas, frascos, tubos de ensayo, medios de cultivo, agua destilada, papeles de filtro, sobres de papel, y demás material fue autoclavado previo a su utilización. El aislamiento y producción de inóculo de los hongos entomopatógenos, se realizó bajo cámara de flujo laminar en el medio de cultivo agar Sabouraud. El mismo se preparó según la siguiente fórmula: peptona 10 g; dextrosa 40 g; extracto de levadura 20 g; agar 20 g; agua destilada 1000 mL.

2) Aislamiento de *B. bassiana*

Se recolectaron muestras de los primeros 15 cm de suelo en las localidades de Las Flores y Junín (Provincia de Buenos Aires). Una vez en el laboratorio, las muestras fueron colocados individualmente en vasos de precipitación: 10 g de suelo + 90 mL de agua destilada estéril (ADE) + 0,5 mL de Tween 80 (tensioactivo); se agitaron por unos minutos y de este modo se obtuvieron las distintas “suspensiones madre”, a partir de las cuales se realizaron las respectivas diluciones decimales seriadas hasta 10^{-6} . Los aislamientos se efectuaron a partir de las tres últimas diluciones (10^{-4} - 10^{-6}), transfiriendo

1 mL de cada una de ellas a distintas cajas de Petri donde finalmente, se agregó 10 mL de agar Sabouraud + 0,05 g/L de cloranfenicol/caja para inhibir el crecimiento bacteriano. Las cajas se incubaron en estufa (25°C y 70% HR) por 7 días para promover el desarrollo de las colonias y 7 días en cámara de cría a 24°C, con fotoperíodo de 12/12 horas luz/oscuridad + luz NUV (near ultra violet) para promover la esporulación (Fig. 3). Una vez transcurrido ese período, se realizó la identificación por observación directa de las colonias desarrolladas de *B. bassiana*. Aquellas que tenían el aspecto característico de *B. bassiana* (colonia circular blanca de aspecto algodonoso, y posteriormente pulverulento debido a los abundantes conidios), fueron repicadas a cajas de Petri con medio de cultivo. La identificación de la especie fúngica en los aislamientos realizados, fue confirmada mediante la observación microscópica de las estructuras reproductivas. Se obtuvieron cinco cepas de *B. bassiana*, cuatro de Las Flores (cepas 1, 42, 77, 4), y una perteneciente a Junín (cepa Junín), con las cuales se realizaron los bioensayos para determinar su capacidad endofítica en plantas de maíz y como agentes de biocontrol en *S. frugiperda*.

3) Preparación del inóculo

Las cepas aisladas fueron repicadas en medio agar Sabouraud e incubadas 7 días en estufa a 25°C y 7 días en cámara de cría a 24°C, con fotoperíodo de 12/12 horas luz/oscuridad + luz NUV. A partir de estos cultivos se prepararon las respectivas suspensiones de conidios. Para ello, se agregó a las cajas con colonias de *B. bassiana*, ADE + Tween 80. Luego, se removieron los conidios raspando la superficie suavemente con un ansa (Fig. 4). Las suspensiones obtenidas fueron filtradas para remover restos de micelio, se colocaron en tubos de ensayo y se agitaron mediante vortex para su homogeneización. Posteriormente se tomó una alícuota de cada una de las “suspensiones madre” y se las colocó en cámara de Neubauer (Fig. 5) en la que se

realizó el conteo de esporas (determinándose así la concentración inicial de esporas C_i). La cámara consiste en un portaobjeto marcado con una cuadrícula de dimensiones conocidas, que facilita el recuento de las esporas bajo microscopio óptico. La concentración final (C_f) para la inoculación (1×10^8 esporas/mL) se ajustó mediante el empleo de la siguiente fórmula:

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

donde:

V_i : volumen inicial (mL) que se extrae de la suspensión madre para alcanzar la concentración deseada en el V_f .

C_i : número de esporas estimado en la suspensión madre.

V_f : volumen (mL) de suspensión que se desea preparar con la concentración ajustada.

C_f : número de esporas de la concentración final.

4) Inoculación de *B. bassiana*

Utilizando las cinco cepas del hongo y con el objeto de comparar el método más eficiente para lograr el establecimiento endófito de las cepas, se emplearon tres técnicas: a) inoculación por inmersión de semillas; b) riego del suelo y c) pulverización de hojas. En todos los ensayos se emplearon semillas de maíz no *Bt*, del híbrido DM 2738 RR2.

4.a) Inoculación por inmersión de semillas germinadas en suspensión de esporas

La germinación de las semillas se realizó en cajas plásticas estériles sobre papel absorbente humedecido con ADE para mantener la humedad adecuada. Las semillas depositadas en las cajas fueron previamente desinfectadas con solución acuosa de NaClO al 5% durante 10 minutos y luego lavadas tres veces con ADE. Las cajas fueron

llevadas a la cámara de cría con temperatura y humedad controlada a 24°C, fotoperiodo 12/12 horas luz/oscuridad durante una semana.

Obtenidas las semillas germinadas se realizó la inoculación con las distintas cepas de *B. bassiana*. En cinco vasos de precipitación estériles se volcaron individualmente las suspensiones de cada cepa sumergiendo en ellas durante 10 minutos las semillas germinadas. Luego, las semillas se sembraron en macetas plásticas con un diseño experimental de 10 repeticiones por cepa (10 macetas con 5 semillas cada una), con tierra previamente tinalizada, o sea esterilizada en autoclave a 120°C por 30 minutos durante tres días consecutivos.

Las macetas se llevaron al invernáculo y se realizó el mantenimiento correspondiente en cuanto a riego y ventilación.

4.b) Inoculación por riego con suspensión de esporas

Se sembraron las semillas de maíz en macetas plásticas con tierra tinalizada. Previa siembra, las semillas fueron desinfectadas como en el caso anterior. Se utilizó el mismo diseño experimental y mantenimiento de las plantas descrito anteriormente. A la semana de la siembra, cuando emergieron las plántulas, se realizó la inoculación de las distintas cepas regando el suelo con las suspensiones del hongo.

4.c) Inoculación por aspersión directa sobre las hojas

Se cultivaron plantas de maíz en macetas plásticas según los procedimientos y el diseño experimental antes descrito. A las tres semanas, una vez obtenidas las plantas con dos hojas, se aplicaron las distintas suspensiones de esporas mediante un pulverizador manual.

Las macetas permanecieron en el invernáculo con el mantenimiento correspondiente en cuanto a riego y ventilación.

5) Evaluación de la capacidad endofítica de *B. bassiana*

Para determinar y comprobar la capacidad de colonización de las cepas del hongo sobre las plantas de maíz en los distintos métodos de inoculación, se llevó a cabo la extracción de muestras de tejidos provenientes de hojas y tallos, a los 60 y 90 días de transcurrida la inoculación.

Para estandarizar la metodología se seleccionó aleatoriamente, para cada cepa y método de inoculación, una planta al azar y dentro de la misma se trabajó con la hoja terminal y el tallo.

A partir de la hoja, eliminando 5 cm terminales y 5 cm basales, se obtuvieron dos muestras, la basal y la apical. Del tallo se obtuvieron tres muestras, la basal, la central y la apical, de la misma manera descrita anteriormente. Las muestras se desinfectaron colocándolas 1 minuto en alcohol etílico al 96%, 5 minutos en solución de NaClO al 6%, 30 segundos nuevamente en alcohol etílico y 5 minutos en ADE. Los trozos de tejidos se depositaron en cajas de Petri, con medio de cultivo agar Sabouraud y se incubaron en estufa, con temperatura controlada a 25°C realizándose un seguimiento periódico durante veinte días. Posteriormente, se evaluaron las colonias obtenidas.

Los resultados obtenidos se expresan como positivos (+) cuando se encuentran colonias de *B. bassiana*, identificadas por observación directa. La determinación de la especie fúngica en los aislamientos realizados, fue confirmada mediante observación microscópica de las estructuras reproductivas.

6) Evaluación del control biológico de *B. bassiana* sobre *S. frugiperda*

El ensayo consistió en aplicar en forma directa sobre larvas en estadio L3, las distintas cepas de *B. bassiana*.

Las cepas aisladas fueron repicadas en medio sólido e incubadas 7 días en estufa a 25°C y 7 días en cámara de cría a 24°C, con fotoperíodo de 12/12 horas luz/oscuridad + luz NUV para promover la esporulación. A partir de estos cultivos se prepararon las respectivas suspensiones de conidios a ser inoculadas sobre los insectos blanco y se ajustaron las concentraciones hasta 1×10^8 esporas/mL tal como fue indicado anteriormente.

La metodología utilizada para la inoculación de las cepas consistió en pulverizar las larvas L3 con las respectivas suspensiones fúngicas empleando un asperjador. Luego los insectos se colocaron en frascos de vidrio de 250 mL junto a sus respectivas dietas y por último se llevaron a cámara de cría a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 40%HR.

Se realizaron 3 repeticiones por cepa, con 10 larvas cada una y los respectivos testigos, tratados sólo con ADE + Tween 80 (testigo control) y el tratamiento con insecticida (testigo total), en el cual se utilizó clorpirifos (insecticida fosforado) con una dilución de 300 cm³ en 60 L de agua (Fig. 6). Esta dosis se utilizó en base a ensayos previos donde mediante la misma se obtuvo $\approx 100\%$ de control.

Transcurrida una semana, se retiraron los frascos, y se apartaron los insectos muertos para cada tratamiento en particular, a estos se les realizó cámara húmeda para confirmar la presencia de *B. bassiana*. Esta tarea se realizó según el siguiente protocolo:

Las larvas muertas se desinfectaron colocándolas 30 segundos en alcohol al 70% y 1 minuto en ADE, luego se secaron sobre papel absorbente y se depositaron en pequeñas cajas plásticas, previamente desinfectadas con alcohol al 99% (Fig. 7). Una vez rotulados estos envases con sus respectivas larvas, se llevaron a cajas plásticas más grandes con papel absorbente humedecido en el fondo. Para mantener la humedad saturada en su interior, las cajas se cerraron y las tapas se sellaron con papel film incubando en estufa, con temperatura controlada a 25°C. A través del seguimiento periódico durante 10 días, se evaluaron las larvas con signos típicos de infección por *B. bassiana* (Fig. 8).

7) Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de mortalidad confirmada por micosis fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA y test de Tukey ($\alpha = 0,05$) empleando el software Graph-Pad.

Resultados

5) Evaluación de la capacidad endofítica de *B. bassiana*

El registro de las observaciones de los bioensayos realizados demostró la ausencia de colonización endofítica de las distintas cepas del hongo en todos los métodos de inoculación utilizados (Tablas 1 y 2).

6) Evaluación del control biológico de *B. bassiana* sobre *S. frugiperda*

Los resultados obtenidos se expresan como positivos (+), en caso de observarse en las larvas síntomas de *B. bassiana*, identificada por observación directa. La determinación de la especie fúngica en los aislamientos realizados, fue confirmada mediante observación microscópica de las estructuras reproductivas (Tabla 3).

Los registros de mortalidad demostraron que en el tratamiento insecticida (testigo total) existen diferencias significativas respecto a los demás tratamientos. El tratamiento Bb Junín no varió significativamente con los tratamientos Bb 1, Bb 42, Bb 77 y Bb 4, aunque sí con respecto al control (agua). En los tratamientos Bb 1, Bb 42, Bb 77 y Bb 4 no hubo diferencias significativas entre ellos, ni con el control (Tabla 3 y Grafico 1).

Las pruebas de patogenicidad corroboradas por cámara húmeda, determinaron que la capacidad insecticida de las cinco cepas de *B. bassiana* empleadas en este estudio fue del 4 al 30%. A fin de esquematizar los datos obtenidos anteriormente se realizó un gráfico de barras, donde se expresa el porcentaje de mortalidad para cada tratamiento (Gráfico 1). La cepa de *B. bassiana* aislada de la muestra de suelo de Junín tuvo el mayor efecto sobre la mortalidad de larvas de *S. frugiperda* en estadio L3.

CONCLUSIONES

- Las cepas estudiadas de *B. bassiana* aisladas de suelos, no demostraron capacidad como hongos endófitos para colonizar los tejidos internos de la planta de maíz.
- Las diferencias en la patogenicidad de las cepas del hongo indican su variabilidad para causar infecciones en los insectos. La capacidad letal de las cinco cepas ensayadas fue baja, alcanzando un máximo de mortalidad del 30% con Bb Junín.
- Los resultados demuestran que es necesario aislar y probar una gran cantidad de cepas de distinto origen hasta obtener aquellas que por su actividad endofítica y alto potencial insecticida puedan formularse como un posible agente de control biológico.

BIBLIOGRAFÍA

Akello, J.; Dubois, T.; Coyne, D. and Kyamanywa, S. 2008. Endophytic *Beauveria bassiana* in banana (*Musa* spp.) reduces banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) fitness and damage. Crop Protection, 27: 1437-1441.

Arnold, A.E. and Lewis, L.C. 2005. Ecology and evolution of fungal endophytes and their roles against insects. In: Vega, F.E., Blackwell, M. (Eds.), *Insect–Fungal Associations: Ecology and Evolution*. New York, Oxford University Press, pp. 74-96.

Butt, T.M.; Jackson, C. and Magan, N. 2001. *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, CABI International.

Caballero-Mellado, 2008. El maíz, su origen.

Cañedo y Ames (2004); Nussenbaum y Lecuona (2012). Hongos entomopatógenos, aislamiento, purificación y conservación.

Casmuz, A., Juárez, M.L.; Socías, M.G.; Murúa, M.G.; Prieto, S.; Medina, S.; Willinik, E. and Gastaminza, G. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69: 209-231.

Castlebury, L.A.; Sutherland, J.B.; Tanner, L.A.; Henderson, A.L. and Cerniglia, C.E. 1999. Use of a bioassay to evaluate the toxicity of beauvericin to bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15: 131-133.

Dal Bello, G.; Padín, S.; Juárez, P.; Pedrini, N. and De Giusto, M. 2006. Biocontrol of *Acanthoscelides obtectus* and *Sitophilus oryzae* with diatomaceous earth and *Beauveria bassiana* on stored-grains. *Biocontrol Science & Technology* 16: 215-220.

Gadner, W.A. and Fuxa, J.R. 1980. Pathogens for the suppression of the fall armyworm. Florida Entomol., 63: 439-447.

Gamboa-Gaitán, M.A. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas.

Disponible online: <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v11s1/v11s1a01.pdf>

García, R; Mosquera, M.; Vargas, C y Rojas, L. 2002. Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), plaga del maíz y otros cultivos en Colombia. Revista Colombiana de Entomología, 28: 53-60.

Ghida Daza C. 2013. Situación económica del cultivo de maíz. Campaña 2013/14 en Maíz. Actualización 2013, Informe de Actualización Técnica N° 27. EEA INTA Marcos Juárez: 27 -33.

Gupta, S.; Montllor, C. and Hwang, Y.S. 1995. Isolation on novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. Journal of Natural Products, 58: 733–738.

Humber, R.A. 1998. Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures. USDA-ARS (Suppl.to the 1992 Catalog), Ithaca, NY, USA.

Lacey, L.A.; Frutos, R.; Kaya, H.K. and Vail, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? Biological Control, 21: 230–248.

Leckie, B.M. 2002. Effects of *Beauveria bassiana* mycelia and metabolites incorporated into synthetic diet and fed to larval *Helicoverpa zea*, and detection of endophytic

Beauveria bassiana in tomato plants using PCR and ITS primers (MS thesis). The University of Tennessee, Knoxville.

Lecuona, R.E. 1996. Control microbiano, utopía o realidad. En: Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Lecuona, R.E. (Ed.) Buenos Aires: M. Mas, pp.13-15.

Lezama Gutiérrez, R.; Alatorre Rosas, R.; Bojalil Jaber, L.F.; Molina Ochoa, J.; Arenas Vargas, M.; Gonzalez Ramirez, M. and Rebolledo Dominguez, O. 1996. Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae. Vedia Revista Internacional de Control Biológico, 3: 35-39.

Lezama Gutiérrez, R.; Hamm, J.J.; Molina-Ochoa, J.; López-Edwards, M.; Pescador-Rubio, A.; González-Ramírez, M. and Styer, E.L. 2001. Occurrence of Entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican States of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. Florida Entomologist, 84: 23-30.

Maniania, N.K and Fargues, J. 1985. Susceptibility of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*, to the Fungal Pathogens *Paecilomyces fumosoroseus* and *Nomuraea rileyi*. Florida Entomologist, 68: 178-183.

Menapace, P., Sanchez, D., Grenón, D., Cracogna, M., Vitti D., Pernuzzi, F., Arnold, M. V., Magliano, M. F.(2015). Estudio del riesgo de impacto ambiental de los fitosanitarios más utilizados en el cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*) en el centro-norte de la provincia de Santa Fe (2015). XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas.Santa Fe. p 223.

Murúa, M.G.; Molina-Ochoa, J. and Coviella, C. 2006. Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoids in Northwestern Argentina. Florida Entomologist, 89: 175-182.

Ownley, B.H.; Pereira, R.M.; Klingeman, W.E.; Quigley, N.B. and Leckie, B.M. 2004. *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens. In: Lartey, R.T., Caesar, A.J. (Eds.), Emerging Concepts in Plant Health Management. Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India, pp. 255-269.

Padín, S.; Dal Bello, G. and Fabrizio, M. 2002. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and bean treated with *Beauveria bassiana*. Journal of Stored Products Research, 38: 69-74.

Posada, F.J.; Chaves, F.C.; Gianfagna, T.J.; Pava-Ripoll, M. and Hebbar, P. 2010. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as an endophyte in cocoa pods (*Theobroma cacao* L.). Revista UDCA actualidad & divulgación científica, 13: 71-78.

Reddy, N.P.; Ali Khan, A.P.; Devi, U.K.; Sharma, H.C. and Reineke, A. 2009. Treatment of millet crop plant (*Sorghum bicolor*) with the entomopathogenic fungus (*Beauveria bassiana*) to combat infestation by the stem borer, *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Asia-Pacific Entomology, 12: 221-226.

Rehner, S.A.; Posada, F.; Buckley, E.P.; Infante, F.; Castillo, A. and Vega, F.E. 2006. Phylogenetic Origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana*. Pathogens of the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*. Journal of Invertebrate Pathology, 93: 11-21.

Roberts, D.W. 1989. World Picture of Biological Control of Insects by Fungi. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 84: 89-100.

Sosa, M. 2005. Daño por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz bajo siembra directa en diferentes épocas en el noreste santafesino. Disponible online: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2002/05-Agrarias/A-061.pdf>

Vega-Aquino, P.; Sánchez-Peña, S. and Blanco, C.A. 2010. Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraearileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 103: 145-149.

Villamizar, L.; Arriero, C.; Bosa, F. y Cotes, A. 2004 Desarrollo de preformulados a base de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Colombiana de Entomología, 30: 99-105.

Wagner, B.L. and Lewis, L.C. 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology, 66: 3468-3473.

Willink, E. y Osorio, V.M. 1994. Manejo integrado de plagas en sistemas conservacionistas. Manuales Técnicos (7º Parte). Avance Agroindustrial, 15: 21-24.

Willink, E.; Costilla, M.A. y Osores, V.M. 1990. Principales plagas del maíz: Daños, pérdidas y recomendaciones para la siembra. Avance Agroindustrial, 11: 17-19.

Willink, E.; Forns A. y Osores, V.M. 1994. Plagas en sistemas de producción conservacionista. Generalidades y sus efectos sobre el cultivo de maíz. Avance Agroindustrial, 14: 25-28.

Willink, E.; Osores, V.M. y Costilla, M.A. 1991. El gusano "Cogollero": nivel de daño económico. Avance Agroindustrial, 12: 25-26.

Willink, E.; Osores, V.M. y Costilla, M.A. 1993. Daños, pérdidas y niveles de daño económico por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz. Rev. Ind. y Agric. de Tucumán, 70: 49-52.

Zizka, J. and Weiser, J. 1993. Effect of beauvericin, a toxin metabolite of *Beauveria bassiana*, on the ultrastructure of *Culex pipiens* autogenicuslarvae. Cytobios, 75: 13-19.

Anexo.

Tabla 1: Resultados del aislamiento a los 60 días.

Inoculación por riego			Inoculación por inmersión			Inoculación por aspersión		
Cepas	Muestras	Resultados	Cepas	Muestras	Resultados	Cepas	Muestras	Resultados
Bb 4	MHT ¹	-	Bb 4	MHT	-	Bb 4	MHT	-
	MHB ²	-		MHB	-		MHB	-
	MTT ³	-		MTT	-		MTT	-
	MTC ⁴	-		MTC	-		MTC	-
	MTB ⁵	-		MTB	-		MTB	-
Bb 77	MHT	-	Bb 77	MHT	-	Bb 77	MHT	-
	MHB	-		MHB	-		MHB	-
	MTT	-		MTT	-		MTT	-
	MTC	-		MTC	-		MTC	-
	MTB	-		MTB	-		MTB	-
Bb 42	MHT	-	Bb 42	MHT	-	Bb 42	MHT	-
	MHB	-		MHB	-		M	-
	MTT	-		MTT	-		MTT	-
	MTC	-		MTC	-		MTC	-
	MTB	-		MTB	-		MTB	-
Bb 1	MHT	-	Bb 1	MHT	-	Bb 1	MHT	-
	MHB	-		MHB	-		MHB	-
	MTT	-		MTT	-		MTT	-
	MTC	-		MTC	-		MTC	-
	MTB	-		MTB	-		MTB	-
Bb Junín	MHT	-	Bb jun	MHT	-	Bb jun	MHT	-
	MHB	-		MHB	-		MHB	-
	MTT	-		MTT	-		MTT	-
	MTC	-		MTC	-		MTC	-
	MTB	-		MTB	-		MTB	-

¹ MHT: muestra de hoja terminal.

² MHB: muestra de hoja basal.

³ MTT: muestra de tallo terminal.

⁴ MTC: muestra de tallo central.

⁵ MTB: muestra de tallo basal.

Tabla 2: Resultados del aislamiento a los 90 días.

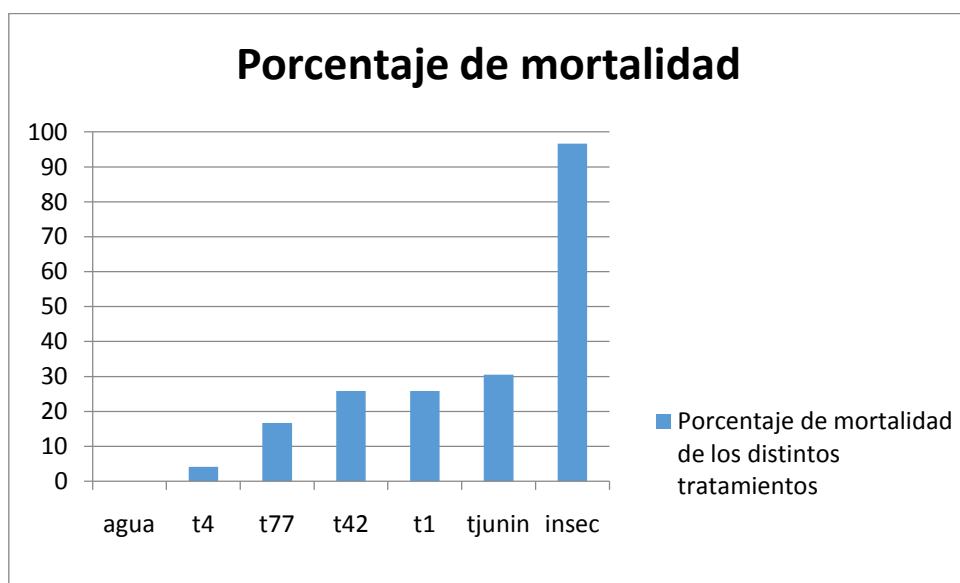
Inoculación por riego	Inoculación por inmersión	Inoculación por aspersión
-----------------------	---------------------------	---------------------------

Cepas	Muestras	Resultados	Cepas	Muestras	Resultados	Cepas	Muestras	Resultados
Bb 4	MHT ¹	-	Bb 4	MHT	-	Bb 4	MHT	-
	MHB ²	-		MHB	-		MHB	-
	MTT ³	-		MTT	-		MTT	-
	MTC ⁴	-		MTC	-		MTC	-
	MTB ⁵	-		MTB	-		MTB	-
Bb 77	MHT	-	Bb 77	MHT	-	Bb 77	MHT	-
	MHB	-		MHB	-		MHB	-
	MTT	-		MTT	-		MTT	-
	MTC	-		MTC	-		MTC	-
	MTB	-		MTB	-		MTB	-
Bb 42	MHT	-	Bb 42	MHT	-	Bb 42	MHT	-
	MHB	-		MHB	-		M	-
	MTT	-		MTT	-		MTT	-
	MTC	-		MTC	-		MTC	-
	MTB	-		MTB	-		MTB	-
Bb 1	MHT	-	Bb 1	MHT	-	Bb 1	MHT	-
	MHB	-		MHB	-		MHB	-
	MTT	-		MTT	-		MTT	-
	MTC	-		MTC	-		MTC	-
	MTB	-		MTB	-		MTB	-
Bb Junín	MHT	-	Bb jun	MHT	-	Bb jun	MHT	-
	MHB	-		MHB	-		MHB	-
	MTT	-		MTT	-		MTT	-
	MTC	-		MTC	-		MTC	-
	MTB	-		MTB	-		MTB	-
¹ MHT: muestra de hoja terminal.								
² MHB: muestra de hoja basal.								
³ MTT: muestra de tallo terminal.								
⁴ MTC: muestra de tallo central.								
⁵ MTB: muestra de tallo basal.								

Tabla 3: Resultados tests de patogenicidad

		<i>Error Est.</i>	
<i>Tratamientos</i>	<i>Media</i>	<i>(individual)</i>	<i>Significancia</i>
agua	0	0	a
Bb 4	4,16667	4,16667	ab
Bb77	16,6667	4,16667	ab
Bb42	25,8333	7,94949	ab
Bb1	25,8333	7,94949	ab
BbJunin	30,4767	5,0389	b
insecticida	96,6667	3,33333	c

Gráfico 1





Posturas de huevos de cogollera



Masa de huevos algodonosa (vista a campo)



Masa de huevos (sin protección)

Figura 1: *Spodoptera frugiperda*, a: estado adulto, b: estado larval, c: posturas de huevos.

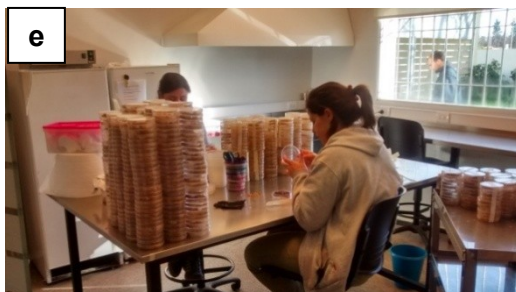


Figura 2: a: cámara de cría de insectos adultos, b: adultos con sus posturas separados individualmente, c: cajas de Petri con posturas únicamente, d: cámara de cría de larvas L1, e: elaboración de alimento.



Figura 3: Colonias de *B. bassiana* en agar Sabouraud.



Figura 4: Raspado de colonias para preparar la suspensión de esporas.

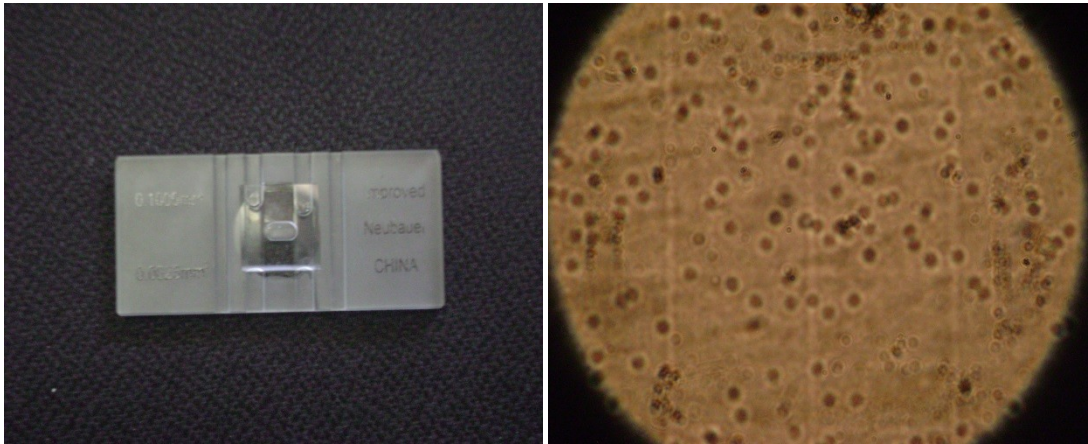


Figura 5: izq.: cámara de Neubauer; der: campo cámara de Neubauer.



Figura 6: Bioensayos de patogenicidad.



Figura 7: Cámaras húmedas.



Figura 8: Larvas de *S. frugiperda* colonizadas por *B. bassiana*.